

P-633-1 (12)

**FREEZING REGENERATION OF COLLECTED LUMP OF SHOOT PRIMORDIUM OF WOODY PLANT**

**Patent number:** JP4281723  
**Publication date:** 1992-10-07  
**Inventor:** TATE NAOMI; ITO KAZUYA; SHIBATA MASARU  
**Applicant:** OJI PAPER CO  
**Classification:**  
- international: **A01F25/00; A01H4/00; A01N3/00; A01F25/00;  
A01H4/00; A01N3/00; (IPC1-7): A01F25/00; A01H4/00;  
A01N3/00**  
- european:  
**Application number:** JP19910067551 19910308  
**Priority number(s):** JP19910067551 19910308

Report a data error here

**Abstract of JP4281723**

**PURPOSE:** To obtain a method of readily regenerable freezing preservation of shoot primordium of woody plant. **CONSTITUTION:** Collected lump of shoot perimordium of woody plant is previously cultured in a medium of gamboge B5 containing a plant growth hormone and sucrose, dehydrated with glycerol, etc., temperature is gradually dropped to -30 to -60 deg.C, the collected lump is frozen, preserved and then cultured in a solid medium of gamboge B5 blended with a plant hormone and agar and the collected lump of shoot perimordium is recovered.

---

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-281723

(43) 公開日 平成4年(1992)10月7日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 01 H 4/00		8502-2B		
A 01 F 25/00	Z	6852-2B		
A 01 N 3/00		6742-4H		

審査請求 未請求 請求項の数1(全 5 頁)

(21) 出願番号	特願平3-67551	(71) 出願人	000122298 王子製紙株式会社 東京都中央区銀座4丁目7番5号
(22) 出願日	平成3年(1991)3月8日	(72) 発明者	館 尚美 三重県亀山市能褒野町24-9 王子製紙株式会社林木育種研究所亀山研究室内
		(72) 発明者	伊藤 一弥 三重県亀山市能褒野町24-9 王子製紙株式会社林木育種研究所亀山研究室内
		(72) 発明者	柴田 勝 三重県亀山市能褒野町24-9 王子製紙株式会社林木育種研究所亀山研究室内
		(74) 代理人	弁理士 中本 宏 (外2名)

(54) 【発明の名称】 木本性植物の苗条原基集塊の凍結再生方法

(57) 【要約】

【目的】 再生の容易な、木本性植物の苗条原基の凍結保存法を提供することを目的とする。

【構成】 木本性植物の苗条原基集塊を植物成長ホルモン及びショ糖を加えたガンボーグのB5培地で前培養し、グリセリン等で脱水処理し、-30~-60℃まで徐々に温度を下げた後、凍結保存し、ついでガンボーグのB5培地等に植物ホルモン及び寒天を加えた固形培地上で培養し、苗条原基集塊を回復させる方法である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 木本性植物の苗条原基集塊を前培養、ついで脱水処理、低温処理を経て液体窒素中に保存し、回復に際しては融解を経て回復培養を行う木本性植物の苗条原基集塊の凍結再生方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、木本性植物の苗条原基集塊を凍結保存し、さらに保存した苗条原基集塊を回復培養して植物体を再生する方法に関するものである。さらに詳しくは、これまでに行われている通常の凍結保存法では植物体に再生することが困難な、あるいは不可能な種類の木本性植物の苗条原基であっても、前培養、脱水処理、低温処理を経て凍結保存し、さらにこれの回復培養に際しては、融解処理を経て、寒天、ゲランガム、など支持媒体を含む培地上に置いた天然または合成繊維系の支持体の上で行うことによって木本性植物の苗条原基の回復を可能にする方法である。この方法を利用することにより、木本性植物の苗条原基集塊の遺伝子特性を変化させることなく、長期間保存することが可能となる。

## 【0002】

【従来の技術】約40年ほど前に、グリセリンあるいはジメチルスルホキシド(DMSO)などに凍結防止効果があることが示されて以来、動物培養細胞、精子、癌細胞などの凍結保存技術が確立されてきた。

【0003】植物の凍結保存は、さまざまな組織の細胞、組織あるいは器官について行われているが、保存した組織等をカルスを經由して植物体に再生させる場合には、親植物と遺伝子型が異なる植物が含まれる恐れが高い。これを回避するこめの方法として、カーネーション、イチゴ、エンドウ、パレイショ等で茎頂を凍結保存する方法の成功例が報告されている。この場合に、凍結防衛剤としては5~11重量%のジメチルスルホキシド(DMSO)を使用し、0.5℃/分前後の速度で約-40℃まで予備凍結したのち液体窒素へ入れて保存する。そして、保存した組織等の融解は温湯で急速に行っている。

【0004】一方、草本性植物をはじめとして、木本性植物でも茎頂をはじめとして、茎、葉、胚軸、子葉、未熟あるいは成熟した胚などから誘導されたカルス、主に未分化な組織から誘導されたカルスから作出された体細胞などから苗条原基を誘導することが可能な種が増加してきている。苗条原基はその特徴として遺伝的な安定性が高く、また苗条の再生能が高いことが知られており、凍結保存の材料としては好適である。草本性植物の苗条原基の凍結保存法については、谷口・田中(1987年、酒井明編、凍結保存、p245-250)が報告しているが、その手法を木本性植物に応用した場合には、回復する苗条原基の割合が低く、苗条が再生しないとい

う欠点があった。本発明者らは、このような欠点を改善して、木本性植物由来の苗条原基集塊を凍結保存し、さらに、これの回復培養を良好に行う方法を発明した。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】従来行われている植物体の凍結保存法では不可能であった木本性植物の苗条原基集塊の凍結保存を可能にし、また凍結保存した苗条原基集塊の回復培養を可能にすることを目的とする。

## 【0006】

【問題点を解決するための手段】本発明は、木本性植物の苗条原基集塊を前培養、ついで脱水処理、低温処理を経て液体窒素中に保存し、回復に際しては融解を経て回復培養を行う木本性植物の苗条原基集塊の凍結再生方法である。以下、本発明に用いた苗条原基集塊の作出方法、前培養方、凍結処理法、保存した苗条原基集塊の回復培養法等について詳しく説明する。

## 【0007】木本性植物の苗条原基集塊の作出方法

草本性植物の場合と同様に、あるいは、樹種によって殺菌方法を変えて木本性植物の種子を殺菌し、寒天培地上で無菌的に成長させる。次に、成長させた苗条の2~3枚の微小葉原基を含む茎頂部を無菌的に實體顕微鏡下でピンセットとメスを用いて摘出する。摘出した茎頂を2,000~20,000ルクスの連続照明下で0.5~5rpmの低速で回転する縦型回転培養装置を使用して培養する。

【0008】この時の培地としては、B5培地等に植物ホルモン類、例えばナフタレン酢酸(NAA)、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)あるいはインドール酢酸(IAA)等のオーキシニン類およびベンジルアデニン(BA)、カイネチン、1-(2-クロロ-4-ピリジン)-3-フェニルウレア(4PU)あるいはゼアチン等のサイトカイニン類を添加した液体培地が用いられる。ただし、植物の種類によっては、どちらか一方のホルモン類のみを添加する場合もある。そして20~30℃で30~60日間培養することによって苗条原基集塊が得られる。

## 【0009】前培養

上記の方法で得た苗条原基集塊をピンセット等を使って2~3mm前後の大きさに分割する。これをB5培地等に植物ホルモン類、例えばNAA、2,4-DあるいはIAA等のオーキシニン類、およびBA、カイネチン、4PUあるいはゼアチン等のサイトカイニン類とショ糖を添加した液体培地(苗条原基の誘導あるいは増殖に使用する培地)を用いて3~10日間20~30℃の温度で前培養する。なお、前培養は苗条原基の作出と同じく回転培養下で行う。

## 【0010】脱水処理

グリセリン、DMSO、ソルビトール、ショ糖等の凍結防衛剤で脱水処理をする。

## 【0011】低温処理

-30~-60℃まで徐々に温度を下げる。

【0012】凍結保存

液体窒素に移して、この中で保存する。

【0013】融解処理

凍結処理された分割した苗条原基集塊を35~70℃の温浴中に移して、ここで急速に融解する。

【0014】回復培養

融解した苗条原基を、例えばガンボークのB5培地、ムラシゲ・スコーグのMS培地等を苗条原基の性質に応じて選択し、植物ホルモン類、例えばNAA、2, 4-DあるいはIAA等のオーキシン類およびBA、カイネチン、4PUあるいはゼアチン等のサイトカイニン類を添加した培地（前培養で使った培地）を寒天で固め、その培地上にろ紙等を敷いてその上で無菌的に10~30日間培養して、緑色の苗条原基集塊を回復させる。この際どちらか一方の種類の植物ホルモンのみを使用することも可能である。この時の培養条件は、2, 000~7, 000ルクスの照度、20~30℃の温度が好ましい。

【0015】回復してきた苗条原基集塊をガンボークのB5培地に植物ホルモンとして例えばNAA、2, 4-DあるいはIAA等のオーキシン類およびBA、カイネチン、4PUあるいはゼアチン等のサイトカイニン類を添加して寒天で固め、前述と同様の培養条件で30~90日培養して植物体を再生させる。この際どちらか一方の種類の植物ホルモンを使用することも可能である。

【0016】

【実施例】次に、実施例によって、本発明をさらに具体的に説明する。

実施例1

供試植物

ユーカリ（*Eucalyptus saligna* 以下、*E. saligna* と記す）。

*E. saligna* の苗条原基集塊の作出方法

*E. saligna* の種子を10倍希釈したアンチホルミンで1時間殺菌し、さらに、無菌的に70%エタノールで15秒間および5倍に希釈したアンチホルミンに20分間浸漬して殺菌後、滅菌水で3回洗浄した。これを、無菌的に表1に示すガンボークのB5培地に3%のショ糖および0.6%の寒天を含む培地上に植え付けて培養した。培養は、28℃の温度、4,000ルクスの照度、16時間の明条件下で行った。植え付け後約20日間生育させた幼植物から、0.1%ポリビニルピロリドン（PVP）を加えた液中で約0.5mmの大きさの生長点を含む茎頂部を摘出した。これをガンボークのB5培地に植物ホルモンとして0.02mg/lのNAA、0.5mg/lの4PUおよびショ糖3%を添加し、pH5.6に調整した液体培地に入れ型回転培養装置で培養した。培養条件は28℃の温度、最高照度15,000ルクス、2rpmの回転速度とした。これによって約4カ月で苗条原基集塊が誘導された。なお、この苗条原基集塊は、新鮮な培地に継代をすることにより、長時間安定に維持することができる。

【表1】

成 分 名		濃 度 (mg/l)
ガンボーク のB5培地	KNO <sub>3</sub>	2,500
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	250
	MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	10
	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2
	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.025
	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	150
	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.025
	KI	0.75
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	150
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.25
	FeEDTA	40
	チアミンHCl	10
	ニコチン酸	1
	ピリドキシンHCl	1
	ミオイノシトール	100
pH		5.6

## 【0017】前培養

継代後2週間目の苗条原基集塊をピンセットを使って2～3mm前後の大きさに分割して、組織培養培地であるガンボークのB5培地にショ糖3%および植物ホルモンとして、NAAを0.02mg/リットル、4PUを0.5mg/l加えた液体培地で5日間前培養した。その後、上記培地のショ糖濃度を0.5Mにかえて2日間培養した。培養条件は、28℃の温度、最高照度15,000ルクス、2rpmの回転速度とした。

## 【0018】脱水処理

前培養した苗条原基集塊を3Mグリセリンと0.5Mソルビトールを添加した凍結防凍剤に10分浸漬して脱水処理を行った。

## 【0019】低温処理

-35℃のフリーザーの中に45分間置いて低温処理した。

## 【0020】凍結保存

液体窒素の中に移して、ここで保存する。

## 【0021】融解処理

回復培養を行うに際して、液体窒素の中から保存してある苗条原基集塊を取り出して、40℃の温浴中で急速に融解する。

## 【0022】回復培養

融解した苗条原基集塊を、表1に示すガンボークのB5培地にショ糖3%、寒天0.6%、植物ホルモンとして、めうを0.02mg/l、4PUを0.5mg/l加えた寒天培地上に置いた2枚のろ紙（東洋濾紙（株）

No. 2、直径60mm）上に置床し、これを28℃の温度、3,000ルクスの照度で培養した。なお、この培養は直径9cmのシャーレの中で無菌的に行った。培養開始後、約20日で緑色の苗条原基集塊が回復してきた（図1参照）。

【図1】なお、この苗条原基集塊を同一組成の液体培地へ移植し、これを回転培養して苗条原基を維持、増殖させることも可能である。

## 【0023】植物体再生

回復した苗条原基集塊を表1に示すガンボークのB5培地にショ糖3%、寒天0.6%、植物ホルモンとして、0.02mg/lのNAA、0.2mg/lの6-BAを加えて寒天培地上に移植して培養を継続した。約50日目で4～5mmの茎葉体が苗条原基集塊1個当たり3～5本生じる。図2は移植後90日目のE. salignaの苗条原基集塊から苗条が苗化した状態を示す写真である。30日間凍結保存した苗条原基集塊から苗条を回復させることが可能であった。

【図2】次に、この苗条が約10～15mmに生育した時に、その基部から切り取って、表1に示すガンボークのB5培地にショ糖3%、0.4%寒天、植物ホルモンとして、0.01mg/l NAA添加した培地に移植して発根させ、植物体を得た。

## 【0024】比較例

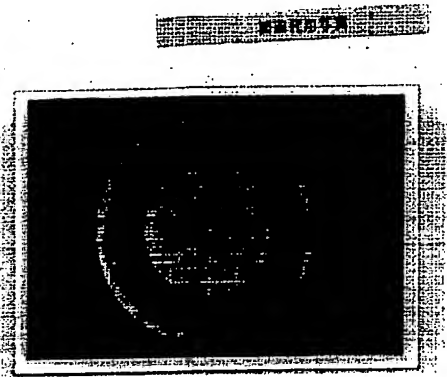
実施例で使用したのと同じ苗条原基集塊を用いた。これをさきに述べた谷口・田中（1987年）の手法、すなわち、5%DMSOを含むB5培地（組成は実施例と

同じ)で2日間前培養し、その後0℃で1時間かけてDMSO濃度を10%に高め、30分放置した。0.5℃/分の冷却速度で-40℃まで冷却したのち液体窒素に浸漬した。実施例と同様な方法で融解したのち、洗浄しDMSOを除去した。洗浄された苗条原基集塊を苗条原基集塊増殖用の培地(実施例1)に移し、回転培養を行ったが苗条原基の回復は認められなかった。

【0025】

【発明の効果】従来行われている植物体の凍結保存法で

【図1】



は不可能であった苗条原基集塊の凍結保存を可能にし、また、凍結保存した苗条原基集塊の回復培養が可能になった。

【図面の簡単な説明】

【図1】凍結保存した苗条原基集塊を、寒天培地上に敷いたろ紙上で20日間回復培養して、緑色の苗条原基が回復した状況を示す図。

【図2】回復した苗条原基を移植して90日後の苗条原基集塊から苗条が苗化した状態を示す図。

【図2】

